



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Interacciones de microplásticos de polietileno con microorganismos y con otros contaminantes ambientales: papel como potenciales vectores de contaminación.

Autor: Silvia Blázquez Hernández
Tutor/es: María del Carmen Fajardo Adán

2021

Resumen

La presencia de microplásticos (MPs) en el medio ambiente es un tema de creciente preocupación por su pequeña escala, que hace que sean fácilmente ingeridos por organismos, y, por la unión en su superficie de sustancias tóxicas y comunidades microbianas, actuando así como potenciales vectores de contaminación. En este trabajo se ha estudiado la capacidad de MPs de polietileno blanco (W-MP) para interactuar con distintos contaminantes orgánicos e inorgánicos, y para actuar como sustrato para la formación de biopelículas microbianas. Así mismo, se ha evaluado el impacto de dichas biopelículas en la adsorción de los contaminantes en estudio.

Soluciones acuosas de Cu (II) y Zn (II) (10 ppm) y de contaminantes orgánicos (colorantes, fármacos, aditivos) a distintas concentraciones, se incubaron con W-MP (1% w/v) durante 96 y 72 h, respectivamente. Los resultados obtenidos reflejaron que la adsorción de metales aumentaba con el tiempo de exposición, siendo máxima para el Cu (II) después de 96 h (59,6 µg/g MP). Entre los contaminantes orgánicos testados, los W-MPs adsorbieron eficientemente algunos de los colorantes, encontrando máximos de 86,3 %, 29,5% y 26,8% para el Brilliant Green, Azul de Metileno y Cristal Violeta, respectivamente.

Se evaluó la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para desarrollar biopelículas sobre la superficie de W-MP (0,5 % y 1 % w/v), caracterizándose la misma mediante técnicas de microscopía y espectroscopia vibracional, y cuantificando la biomasa formada. Cuando los contaminantes fueron expuestos a la biopelícula formada sobre los MPs (1% w/v), se encontró que la sorción era superior, particularmente en el caso de compuestos orgánicos.

Los resultados obtenidos señalan que los W-MPs pueden actuar como vectores de contaminación biótica y abiótica en medio acuoso, destacando el potencial papel de las biopelículas formadas en la acumulación de contaminantes ambientales.

Palabras clave: Microplásticos; contaminantes orgánicos; metales pesados; biopelículas; capacidad de sorción

Abstract

The presence of microplastics (MP) in the environment is a matter of growing concern because of their small scale, which makes them easily ingested by organisms, and because of the union on their surfaces of toxic substances and microbial communities, thus acting as potential vectors of pollution. In this work, the ability of white polyethylene (W-MP) MPs to interact with different organic and inorganic pollutants, and to act as a substrate for the formation of microbial biofilms, has been studied. Likewise, the impact of these biofilms on the adsorption of the tested contaminants has been evaluated. Aqueous solutions of Cu (II) and Zn (II) (10 ppm) and organic contaminants (dyes, pharmaceuticals, additives) at different concentrations, were incubated with W-MP (1% w/v) for 96 and 72 h, respectively. The results obtained showed that the adsorption of metals increased with the exposure time, being maximum for Cu (II) after 96 h (59.6 µg/g MP). Among the organic contaminants tested, the W-MPs efficiently adsorbed some of the dyes, showing maximum sorption percentages of 86,3 % 29,5 % and 26,8 % for Brilliant Green, Methylene Blue, and Violet Crystal, respectively.

The ability of *Pseudomonas aeruginosa* to develop biofilms on the surface of the W-MP (0.5% and 1% w/v) was evaluated; further, biofilm was characterized using microscopy and vibrational spectroscopy techniques and quantifying the biomass formed. When pollutants were exposed to the biofilm formed on the MPs (1% w/v), it was found that their sorption was higher, particularly for organic compounds.

The results obtained indicated that MPs can act as vectors for biotic and abiotic contamination in aqueous medium, highlighting the potential role of the biofilms formed in the accumulation of environmental pollutants.

Keywords: Microplastics; organic pollutants; heavy metals; biofilms; sorption capacity

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1 Microplásticos	5
2.2 Caracterización de los microplásticos W-MP	5
2.2.1 Caracterización mediante FTIR-Raman	5
2.2.2 Caracterización mediante SEM	6
2.3 Capacidad de los microplásticos W-MP para adsorber otros contaminantes ambientales	6
2.5 Formación de biopelícula sobre los microplásticos W-MP	9
2.5.1 Recuento de células viables	10
2.5.2 Estimación de biomasa de la biopelícula	10
2.6 Efecto de la biopelícula en la adsorción de otros contaminantes	10
2.6.1 Contaminantes orgánicos	10
2.6.2 Compuestos inorgánicos: cobre	11
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
3.1 Caracterización de los microplásticos W-MP	11
3.2 Capacidad de adsorción de contaminantes ambientales a los microplásticos W-MP	13
3.2.1 Contaminantes orgánicos	13
3.2.2 Contaminantes metálicos	16
3.3 Toxicidad de los microplásticos W-MP: análisis de niveles de expresión de genes de estrés oxidativo	17
3.4 Formación de biopelícula sobre los microplásticos W-MP	19
3.4.1 Caracterización de la biopelícula por FTIR y SEM	20
3.4.2 Estimación de la biomasa de la biopelícula	22
3.5 Efecto de la biopelícula en la adsorción de contaminantes	23
3.5.1 Contaminantes orgánicos	23
3.5.2 Contaminantes metálicos (Cu).....	24
4. CONCLUSIONES.....	25
Bibliografía	26
Anexo I: Tablas	31
Anexo II: Figuras	32

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por plásticos es hoy en día un aspecto de enorme preocupación por los riesgos ambientales y sanitarios asociados a su exposición, considerando que su acumulación en el ambiente ha aumentado hasta los casi 370 millones de toneladas en 2019 (Plastics Europe, 2020). Los residuos plásticos, una vez que llegan al medio ambiente, se degradan por procesos fisicoquímicos y biológicos, dando lugar a partículas más pequeñas. Los microplásticos (MPs) se definen como partículas o fibras de polímeros sintéticos con un diámetro de 1-5000 μm , aunque el límite ha sido rebajado a 0,1 μm por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Triebkorn *et al.*, 2019). Pueden así provenir de bolsas y botellas de polietileno, envases de poliestireno, nylon, polipropileno, de telas, etc., y se denominan MPs secundarios (Cole, 2011; Rillig, 2012; Wahl, 2020). Además de las que se forman a partir de la degradación de plásticos de mayor tamaño, las pequeñas partículas de plástico fabricadas intencionadamente con fines industriales (por ejemplo, impresión 3D, adhesivos, pinturas, productos electrónicos, productos de cuidado personal, etc.) son otra fuente importante de MPs en el medio ambiente (Cole, 2011; Rillig, 2012; Lehner *et al.*, 2019). Estos microplásticos denominados primarios, son, por tanto, emitidos directamente con un tamaño menor a 5 mm a los ambientes naturales.

Los MPs se han detectado en concentraciones variables en todos los compartimentos ambientales, en lagos y ríos (Eriksen *et al.*, 2013), estuarios, suelos, e incluso en los mares más profundos o el hielo polar (Van Cauwenberghe *et al.*, 2013; Obbard *et al.*, 2014). En particular, los MPs de polietileno (PE) se encuentran entre los más comunes en todos los ambientes analizados (Atugoda *et al.*, 2021).

Las fuentes de contaminación por microplásticos son numerosas. Entre ellas, las aguas residuales urbanas son una fuente importante, ya que las estaciones de tratamiento no retienen completamente las partículas debido a su pequeño tamaño y flotabilidad (Browne y Thompson 2011), lo que puede dar lugar a la liberación a las aguas receptoras de concentraciones significativas de estos compuestos. Pero, además, el lodo producido como subproducto, en el que se acumularían mayoritariamente los residuos plásticos, es reutilizado frecuentemente como fertilizante en agricultura, reintroduciendo por tanto estos

contaminantes directamente en el suelo (Corradini *et al.*, 2019). Otras fuentes de contaminación en el suelo son las cubiertas plásticas usadas en invernaderos, o la acumulación en vertederos (Rillig, 2012; He *et al.*, 2019) y, desde ahí, pueden pasar al resto de compartimentos ambientales. En los ecosistemas acuáticos marinos encontramos como fuente de contaminación el turismo de costa, la pesca, actividades como la acuicultura y actividades portuarias (Cole, 2011), aunque la gran mayoría de los MPs (80 %) proceden del ambiente terrestre, y entran al mar a través de los ríos o aguas contaminadas (Andrady, 2011).

La pequeña escala de los MPs los hace más reactivos que sus correspondientes compuestos parentales (Rist y Hartman, 2018). Los MPs se han convertido en un problema crucial por dos razones principales: i) son lo suficientemente pequeños como para ser ingeridos por la biota, lo que puede afectar a la integridad de los organismos y acumularse en la cadena alimentaria, y, ii) pueden adsorber sustancias nocivas y transportarlas al interior de los organismos, aumentando la toxicidad conjunta que se genera por bioacumulación (Yu y Yang, 2019; Atugoda *et al.*, 2021).

Se ha descrito que los MPs pueden convertirse en portadores de otras sustancias debido a su pequeño tamaño de partícula, sus propiedades superficiales, los aditivos que contienen, y su vida media larga (Liu *et al.*, 2020). Por ejemplo, su superficie hidrofóbica se ha relacionado con su capacidad de adsorción de distintos contaminantes del medio circundante, tanto orgánicos como metales (Lithner *et al.*, 2011), y con su capacidad de estimular rápidamente la formación de biopelículas y, por tanto, de convertirse en soportes para la colonización y el transporte de microorganismos potencialmente nocivos.

En este contexto, un punto de especial relevancia es estudiar el comportamiento de los MPs como potenciales vectores de contaminación, es decir, como núcleos de sorción y concentración de otros contaminantes ambientales que podrían así ser transferidos a los organismos y a distintos ambientes. Según se ha demostrado en el medio marino, metales pesados como el Cu y Zn son adsorbidos por esferas de poliestireno (PS) y cloruro de polivinilo (PVC) (Brennecke *et al.*, 2016); de forma similar, Godoy *et al.* (2019) señalaron que metales como el Pb, Cr y Zn, mostraron una alta unión a diferentes tipos de microplásticos en agua desionizada o aguas naturales. Así mismo,

recientemente Elizalde-Velázquez *et al.* (2020) determinaron que la unión de algunos fármacos antiinflamatorios (diclofenaco, ibuprofeno y naproxeno) a MPs de PE y PS era alta. En conjunto, estos resultados indican la capacidad de los MPs para acumular otros contaminantes ambientales sobre su superficie, pero esta capacidad puede verse influenciada por numerosos factores, como el tipo de MP usado, incluyendo su morfología (fibras, esferas, fragmentos, etc.), tamaño, o tipo polímero del que esté compuesto, o de las dosis y condiciones ambientales empleadas. Por tanto, es necesario un esfuerzo investigador que contribuya a avanzar en el conocimiento sobre la naturaleza de las interacciones entre MPs y otros contaminantes y, por tanto, en la potencial toxicidad conjunta de ambos.

Además de una superficie alternativa para determinados contaminantes, los MPs representan un sustrato para la adhesión de microorganismos con la consiguiente formación de comunidades microbianas asociadas. De hecho, se ha sugerido que los MPs pueden considerarse un nicho específico para la vida microbiana, conocido como "plastisfera" (Zettler *et al.*, 2013). Por ejemplo, cuando se liberan en hábitats acuáticos, los MPs pueden flotar durante meses y finalmente acumularse en entornos bentónicos (Eerkes-Medrano *et al.*, 2015; Besseling *et al.*, 2017). Durante su transporte de larga distancia por el flujo de agua y los vientos, los MPs entran en contacto con partículas inorgánicas, compuestos orgánicos y microorganismos planctónicos (Parrish y Fahrenfeld, 2019), pudiendo servir como superficies para la colonización de estos (Harrison *et al.*, 2014; De Tender *et al.*, 2015; Rummel *et al.*, 2017). Además, los MPs podrían actuar como vectores para el transporte de patógenos o especies dañinas en los ecosistemas naturales (Koelmans *et al.*, 2016; Viršek *et al.*, 2017; Arias-Andres *et al.*, 2018). Por ejemplo, Eckert *et al.* (2018) demostraron que la presencia de MPs promovían la supervivencia de bacterias derivadas de plantas de tratamiento de aguas residuales en masas de agua dulce.

Por lo general, en el agua, las comunidades microbianas existen en forma de biopelículas adheridas a superficies sólidas, con una variedad de microorganismos integrantes y polímeros celulares y extracelulares (Flemming *et al.*, 2016). Esas biopelículas pueden modificar la estructura de los MPs de varias maneras, incluyendo cambios en sus propiedades superficiales, la

degradación de los aditivos contenidos, la secreción de enzimas modificadoras/degradadoras de los MPs o la liberación de subproductos metabólicos (Miao *et al.*, 2019). Por tanto, las biopelículas formadas pueden influir notablemente en el comportamiento y destino de las partículas plásticas (Rummel *et al.*, 2017).

Hoy en día se considera que las biopelículas en ambientes acuáticos son puntos calientes para la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos (ARG) entre bacterias (Abe *et al.*, 2020), lo que constituye un enorme peligro tanto para la salud humana como para la de los ecosistemas naturales.

Además de sus posibles efectos adversos directos sobre la biota, el papel potencial de las biopelículas como vectores de transferencia de contaminantes está recibiendo una atención creciente. Es decir, la formación de biopelículas microbianas sobre las partículas plásticas podría facilitar sus interacciones con otros contaminantes ambientales (Lobelle y Cunliffe, 2011; Kurniawan *et al.*, 2012). Actualmente, debido a la ubicuidad de los MPs, la colonización de las partículas plásticas por parte de los microorganismos se ha convertido en un fenómeno universal, y se han detectado en el medio acuático, terrestre y atmosférico (Lin *et al.*, 2020). Por tanto, los microorganismos colonizadores de MPs son enlaces importantes para comprender los efectos de la contaminación por plásticos en los ecosistemas naturales, pero pese a la clara presencia de estas biopelículas en el medio, las interacciones entre las mismas, los microplásticos y otras sustancias tóxicas no han sido estudiadas con suficiente profundidad.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la capacidad de microesferas de PE blanco (W-MPs) para asociarse con diferentes contaminantes orgánicos (Norfloxacin, Paracetamol, Bisfenol A (BPA), Acido clofibrico, Carbamazepina, New Coccine, Reactive Black 5, Acid Green 25, Bromophenol Blue, Cristal Violeta, Brilliant Green y Azul de Metileno) e inorgánicos (Cu y Zn). Se evaluará, asimismo la interacción de estos W-MPs con microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*), y, de forma específica, la formación de biopelícula sobre su superficie y su impacto sobre la capacidad de los W-MPs para adsorber algunos de los contaminantes, es decir, la potencial capacidad de la biopelícula para actuar como matriz concentradora de los

misimos. De esta forma, se pretende contribuir a dilucidar si los MPs pueden actuar como vectores para la difusión de microorganismos o de otros contaminantes ambientales, lo que podría magnificar su efecto ecológico adverso sobre la biota del compartimento ambiental receptor.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microplásticos

Los microplásticos utilizados fueron microesferas de PE blanco W-MP (1,35 g/cc) adquiridas en Cospheric LLC (Santa Barbara, CA, USA). La concentración de MPs utilizada para los ensayos (0,5 y 1 % w/v) se seleccionó en función de las concentraciones que pueden encontrarse de forma natural en medios acuáticos (Brennecke *et al.*, 2016).

2.2 Caracterización de los microplásticos W-MP

2.2.1 Caracterización mediante FTIR-Raman

Para la caracterización de los W-MPs, se utilizaron dos técnicas de espectroscopía vibracional: Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) y Raman.

Para la espectroscopía de infrarrojos, las muestras de W-MP se secaron durante 24 h en una cabina de flujo laminar. Posteriormente se realizaron las mediciones utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet iS20 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) asociado al software OMINC. Las muestras se midieron con una resolución de 4 cm⁻¹ a 64 Scans y en un rango de 600-4000 cm⁻¹. El mismo procedimiento se siguió para caracterizar la biopelícula formada sobre los MPs en estudio.

Para la técnica de Raman, se utilizó el espectrómetro Raman DXR2 (Thermo Scientific Inc., MA, USA) con software OMNIC acoplado. Las muestras de W-MP se colocaron en un portaobjetos y se aplicó un láser de 532 nm con una potencia de 8 mW; el rango de medición utilizado fue de 50-3200 cm⁻¹ y el tiempo de medición para cada espectro fue de 1 minuto con 3 exposiciones por segundo (total de 20 exposiciones). Para observar las muestras se utilizó un objetivo de 50x y una apertura de 50 µm slit. En ambos casos se realizaron 10 espectros de cada muestra y finalmente se hizo la media de cada muestra.

2.2.2 Caracterización mediante SEM

Las muestras W-MP, después de un paso previo de metalizado, se observaron mediante SEM utilizando el microscopio electrónico de barrido JSM6400 (ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica, CAI-Universidad Complutense de Madrid, UCM). Para observar la biopelícula que se había formado sobre los W-MPs estudiados, las muestras fueron previamente fijadas con una solución de paraformaldehído (4 % v/v) y glutaraldehído (2.5 % v/v), manteniendo las muestras a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo, cada muestra se lavó con agua destilada, realizándose posteriormente la deshidratación incubando las muestras en distintas disoluciones de concentraciones crecientes de etanol.

2.3 Capacidad de los microplásticos W-MP para adsorber otros contaminantes ambientales

2.3.1 Contaminantes orgánicos

Se determinó la capacidad de los W-MPs para adsorber distintos compuestos orgánicos. Se utilizaron 4 fármacos: Norfloxacin, Paracetamol, Ácido clorhídrico y Carbamazepina (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany); 7 colorantes: New Coccine, Reactive Black 5, Acid Green 25, Brilliant Green (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), Cristal Violeta, Bromophenol Blue (Scharlab S.L. Spain) y Azul de Metileno (PanReac Applichem ITW Regents, Spain); y el aditivo bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany).

Para optimizar el método de detección y cuantificación de los compuestos en estudio se realizaron espectros de absorción de cada uno de ellos, con el fin de obtener la concentración óptima y la longitud de onda a la que se daban los picos máximos de absorción. Partiendo de una concentración 100 μM , se realizaron diluciones hasta determinar aquella en la que los espectros i) no mostrasen saturación ii) donde los picos máximos de absorbancia se observaron con nitidez. A continuación, se prepararon disoluciones de cada compuesto a las concentraciones seleccionadas (Anexo I: Tabla 1), y se filtraron con un filtro de 0,2 μm de tamaño de poro (Sartorius Minisart 16534-k, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Aunque las concentraciones en el medio ambiente de

estos compuestos suelen ser inferiores, estas concentraciones se utilizaron para evaluar la máxima capacidad de adsorción de los microplásticos en estudio.

Se añadió en tubos eppendorf 1,5 ml de cada compuesto en estudio a la concentración seleccionada, y W-MP (1 % w/v); las muestras se incubaron a 100 rpm y 28 °C, determinándose la absorbancia del sobrenadante a las 24, 48 y 72 h en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Hitachi-Hightech Analytical Systems, Tokyo, Japan), a la longitud de onda determinada de máxima absorbancia para cada compuesto (Anexo I: Tabla 1). Tubos eppendorf conteniendo solo 1,5 ml de cada compuesto, incubados en las mismas condiciones, se usaron como referencia para determinar la cantidad de compuesto adsorbido a los MPs. Tubos eppendorf conteniendo solo agua estéril se usaron como control negativo. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado.

Los porcentajes de adsorción se calcularon, para cada tiempo considerado, de acuerdo con la ecuación (1):

$$\% \text{ adsorción} = \left(\frac{\text{absorbancia blanco} - \text{absorbancia W-MP}}{\text{absorbancia blanco}} \right) \times 100$$

2.3.2 Metales pesados

Se prepararon disoluciones de Cu (II) y Zn (II) a 100 ppm en agua Milli-Q estéril. Posteriormente, se introdujeron en viales 0,3 ml de la disolución de cada metal pesado en estudio, W-MP al 1 % w/v, y 2,7 ml de H₂O Milli-Q estéril. Viales conteniendo solo 0,3 ml de las disoluciones de Cu (II) y Zn (II) y 2,7 ml de agua Milli-Q estéril se usaron como blancos. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado. Las muestras se incubaron a 28 °C, 150 rpm, durante 24, 72 y 96 h. Transcurridos estos tiempos, en matraces aforados de 10 ml, se añadió 0,5 ml de HNO₃ (ppb traza) y 1 ml del sobrenadante de cada muestra incubada, enrasando con agua Milli-Q.

La concentración de Cu (II) y Zn (II) en las muestras se analizó mediante Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), utilizando el equipo ICP-OES Varian 720 (Varian, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE. UU.). Las condiciones de medida utilizadas fueron las siguientes: potencia 1,0 Kw, flujo plasma 15 l/min, flujo auxiliar 1,5 l/min, flujo nebulización 1,0 l/min, tiempo de lectura 10 s, retraso

estabilidad 15 s, retraso toma de muestra: 20 s, velocidad de la bomba 12 rpm, tiempo de lavado 30 s. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de Cu y Zn fueron 324,7554 nm/ 327,3958 nm, y 202,548 nm/213,857 nm, respectivamente. Cada medición se realizó por triplicado.

La diferencia de concentración del metal en estudio entre la fase acuosa de las muestras blanco y de las muestras W-MP se utilizó para determinar la cantidad de compuesto adsorbido, expresando los resultados como µg/g MP.

2.4 Análisis qPCR de genes de estrés oxidativo

Para la realización de los siguientes ensayos se utilizó la cepa de tipo salvaje *Pseudomonas aeruginosa* obtenida de la Colección de Microorganismos existente en el Departamento de Biotecnología y Biomedicina de la UAH. Un cultivo fresco de *P. aeruginosa* crecida en LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) a 37 °C, 150 rpm (overnight), fue inoculado a una concentración final de 5×10^6 cel/ml en 20 ml de agua de peptona (Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), en presencia y en ausencia de W-MP a una concentración de 1 % w/v. Los matraces fueron incubados a 28 °C, 100 rpm, durante 96 h. Transcurrido este periodo, el ARN total se extrajo utilizando el kit Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Canadá). Los extractos de ARN obtenidos se cuantificaron y se comprobó su calidad usando el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek Instruments, Inc., Canadá), y, finalmente, se diluyeron a una concentración final de 75 ng/µL en agua libre de nucleasas. Los ARN diluidos se utilizaron como molde para la transcripción inversa (RT-PCR) utilizando el kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara, Bio, Inc, Shiga, Japan) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un 7500 Fast Real-Time system (Applied Biosystem, CA, EE. UU.), utilizando un volumen final de 20 µl, 0,3 µM de los cebadores oligonucleótidos específicos, 10 µl de SYBR Green PCR mix (TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara, Bio, Inc, Shiga, Japan) y 5 µl del cDNA diluido 10 veces. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 30 sg a 95 °C, 40 ciclos de 5 sg a 95 °C y 34 sg a 60 °C. Se realizó una etapa adicional a partir de 60 °C con pasos crecientes hasta 95 °C (0,2 °C/s) para establecer la curva de desnaturalización específica de la secuencia

amplificada y comprobar la pureza de los productos de PCR. La cuantificación relativa se realizó midiendo los niveles de expresión de los genes diana (*sodB*, *katB* y *trxA*) en comparación con los niveles de expresión del gen 16S rDNA (gen de referencia endógeno). El conjunto de cebadores utilizado se muestra en la Tabla 2 (Anexo I).

2.5 Formación de biopelícula sobre los microplásticos W-MP

Para evaluar la formación de biopelícula sobre los W-MPs en estudio, se utilizó la bacteria *P. aeruginosa*, y el protocolo previamente descrito por Gong *et al.* (2019) con ligeras variaciones. *P. aeruginosa* se cultivó en medio LB a 37 °C con agitación a 150 rpm (overnight). Partiendo de este cultivo fresco se inoculó la bacteria en estudio a una concentración final de 5×10^6 cel/ml en 20 ml de agua de peptona en un matraz de 50 ml conteniendo los W-MP a dos concentraciones diferentes (0,5 y 1 % w/v), previamente esterilizados por exposición a la luz UV (256 nm) durante 15 minutos. Los matraces se incubaron en un agitador orbital (100 rpm) a 28 °C durante 96 h. Matraces conteniendo solo el medio de crecimiento y los MPs a cada una de las concentraciones testadas, fueron usados como controles negativos (CE), mientras que matraces conteniendo agua de peptona y la bacteria en estudio se usaron como control positivo (CC). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado. Adicionalmente se usaron dos replicas más para observar la biopelícula formada mediante FITR y SEM, usando W-MP al 1 % w/v.

Pasado el tiempo de incubación se midió la densidad óptica (680 nm) del medio de cada matraz en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Hitachi-Hightech Analytical systems, Tokyo, Japan) y se realizaron recuentos de células viables en suspensión. Para ello, se tomó 1 ml del medio, se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró, por duplicado, 100 µl de las diluciones en placas de agar nutritivo (8 g/l caldo nutritivo, 5 g/l NaCl, 20 g/l agar). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se contó el número de colonias desarrolladas expresando los resultados como ufc/ml.

A continuación, se eliminó el medio de las muestras, los MPs fueron recolectados y se lavaron mediante vórtex en solución salina normal (0,9% w/v) durante 10 minutos para separar las células adheridas a los MPs. Antes de la desorción, dos

de las réplicas y dos muestras CE se utilizaron para la caracterización de la biopelícula mediante FTIR y SEM, según se describe en el apartado 2.2.

2.5.1 Recuento de células viables

Una vez desorbidas las células de la superficie de los MPs se determinó el número de células viables. Para ello se tomó 1 ml del sobrenadante y se siguió el procedimiento anteriormente descrito.

2.5.2 Estimación de biomasa de la biopelícula

Como la cantidad de proteína extraíble es directamente proporcional al número de microorganismos adheridos (Tribedi y Sil, 2013), la biomasa bacteriana de la biopelícula se estimó determinando la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

Las células desorbidas se centrifugaron durante 1 minuto a 12.000 rpm, se lavaron con solución salina normal, resuspendiéndose finalmente en 500 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). Para la realización del método de Bradford, se siguió el protocolo de Ensayo de proteína Bio-Rad, utilizando el reactivo ácido de Coomassie® tinte G-250 azul brillante (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EE. UU). En primer lugar, se construyó una curva patrón para cada conjunto de muestras analizadas utilizando un patrón de BSA (Bovine Sero Albumin, Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) y diluciones de concentraciones conocidas. A continuación, una alícuota (200 µl) del sobrenadante se mezcló con 200 µl de reactivo y 600 µl de PBS, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Hitachi-Hightech Analytical systems, Tokyo, Japan).

2.6 Efecto de la biopelícula en la adsorción de otros contaminantes

2.6.1 Contaminantes orgánicos

Para este ensayo se procedió a formar de nuevo la biopelícula, según se detalla en el apartado 2.5, utilizando W-MP al 1 % w/v en 20 ml de agua de peptona y con una concentración inicial de células de *P. aeruginosa* de 5×10^6 cel/ml. Matraces conteniendo solo el medio de crecimiento y los MPs fueron usados como controles blancos. El ensayo se realizó por triplicado. Después de la

formación de la biopelícula, se procedió a retirar el medio; de cada matraz, se recogieron los microplásticos con y sin la biopelícula asociada, y se lavaron con 1 ml de solución salina. Una de las muestras se sometió a ciclos de ultrasonidos de 3 min para obtener un control de células muertas y asegurar que la adsorción se diese sobre la biopelícula formada.

A continuación, se añadió a los MPs recogidos 1,5 ml de cada compuesto en estudio. Se utilizaron tres contaminantes, Cristal Violeta, Brilliant Green y Azul de Metileno, a las concentraciones anteriormente referidas (20 μ M). Las muestras se incubaron durante 1 h, a 28 °C y 100 rpm. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante, se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm, y se determinó la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Hitachi-Hightech Analytical systems, Tokyo, Japan). Los porcentajes de adsorción se calcularon según la ecuación 1.

2.6.2 Compuestos inorgánicos: cobre

En este ensayo se procedió a formar la biopelícula de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.5, utilizando W-MP al 1 % w/v en 20 ml de agua de peptona, con una concentración inicial de células de *P. aeruginosa* de 5×10^6 cel/ml, añadiendo Cu (II) a 10 ppm (previamente esterilizado por filtración). El ensayo se realizó por triplicado. Matraces con Cu (II) y W-MP en agua de peptona se utilizaron como CE, aquellos con *P. aeruginosa* y Cu (II) como CC, y matraces conteniendo únicamente Cu (II) en agua de peptona como blanco. Pasadas 96 h de incubación, la concentración de Cu (II) en suspensión se analizó mediante ICP-OES, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los microplásticos W-MP

Se han obtenido los espectros FTIR para los MPs en estudio. En el espectro que aparece representado en la Figura 1A se pueden observar las bandas características del PE. En torno a los 2800-2900 cm^{-1} , se encuentran las bandas simétricas y asimétricas de los enlaces (C-H) (estiramiento del CH_2), y, en torno a los 1420-1450 cm^{-1} las bandas correspondientes a la flexión del CH_2 , tal y como se indica en la Tabla 3 (Anexo I).

Estas bandas se pueden observar igualmente en el espectro Raman representativo del W-MP (Figura 1B), pero puesto que esta técnica analiza un rango superior que el IR, se pueden observar picos por debajo de los 650 cm^{-1} que corresponde a la región representativa del TiO_2 , aditivo que según el fabricante contiene el MP testado.

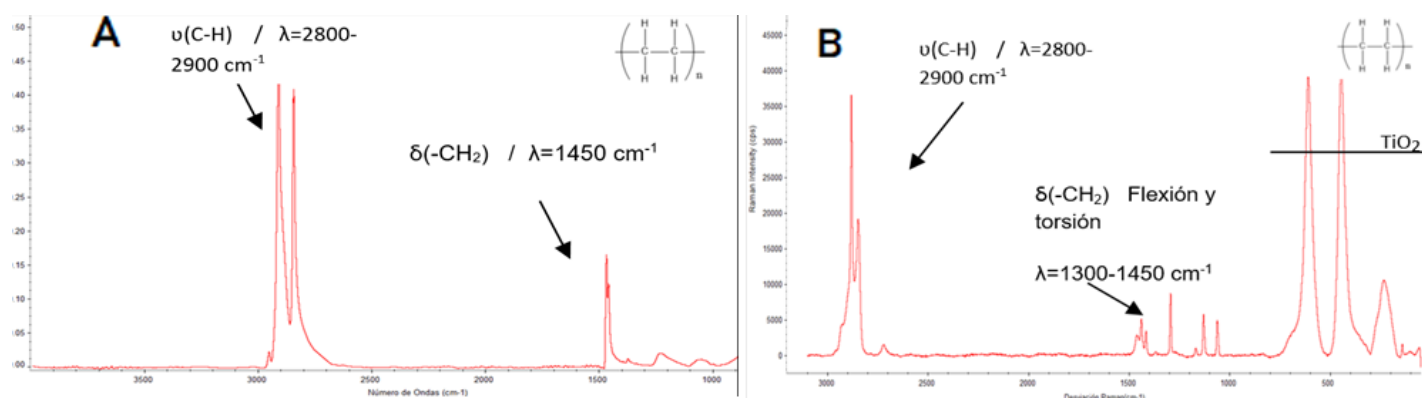


Figura 1. Representación del espectro obtenido del microplástico W-MP mediante A) FTIR, y B) Raman.

La capacidad de sorción de los contaminantes en solución acuosa al plástico depende de las interacciones intermoleculares entre estos y el polímero. Los tipos de interacciones más relevantes para la sorción de sustancias químicas en el agua son las interacciones de van der Waals, las interacciones por puentes de hidrógeno y la formación de cavidades (Endo y Koelmans, 2016). Por lo tanto, es interesante conocer las características fisicoquímicas de los polímeros, que condicionan su capacidad de adsorción y las posibles interacciones que pueden darse entre las moléculas del plástico y la solución acuosa. Por ejemplo, el W-MP contienen un 30 % de TiO_2 que podría actuar aumentando la capacidad de adsorción de determinados compuestos como los metales (Bayo *et al.*, 2017).

Por otro lado, en la Figura 2, se muestran las imágenes obtenidas mediante SEM del microplástico W-MP inicial. Como se puede observar, las

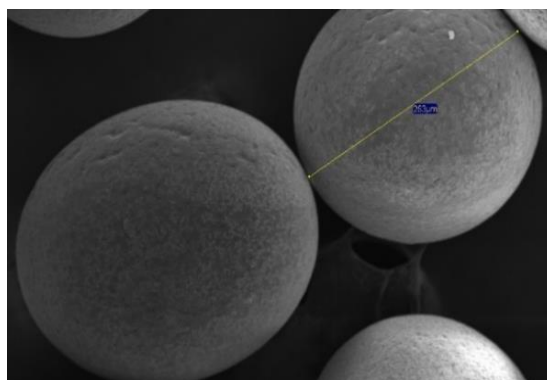


Figura 2: Micrografía obtenida mediante SEM del W-MP en estudio

microesferas, que presentan un tamaño medio de $281 \pm 14 \mu\text{m}$, muestran superficies lisas, sin grandes grietas o irregularidades las cuales podrían dar lugar a una mayor área superficial y, por tanto, a un aumento de la adsorción de compuestos en sus superficies (Godoy *et al.*, 2019).

3.2 Capacidad de adsorción de contaminantes ambientales a los microplásticos W-MP

3.2.1 Contaminantes orgánicos

El impacto de los MPs en el medio ambiente está relacionado con su composición química o con los distintos químicos que potencialmente pueden adsorberse a su superficie. Esto es, los compuestos químicos que pueden ejercer un impacto negativo sobre los organismos pueden estar incluidos en los MPs como aditivos (retardantes de llama, ftalatos, etc.), o bien estar sobre su superficie, de manera que actuarían como vehículos de otros contaminantes. Se ha descrito que la naturaleza hidrofóbica y la elevada relación superficie-volumen de los microplásticos, como es el caso de las microesferas de PE en estudio, facilitarían la acumulación de contaminantes orgánicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bencenos clorados, bifenilos policlorados (PCBs) o compuestos farmacéuticos y productos de cuidado personal (Atugoda *et al.*, 2021 y referencias incluidas).

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de los W-MPs para adsorber un total de 12 compuestos orgánicos. En primer lugar, se ha puesto a punto un método de detección espectrofotométrica de los compuestos en estudio, determinándose la concentración óptima y la longitud de onda de máxima absorción de cada uno de ellos (Anexo I: Figura 1).

Como muestra la Figura 3, los W-MPs a la concentración usada en este trabajo (1 % w/v) adsorben eficientemente algunos de los colorantes testados, encontrándose porcentajes máximos de adsorción a las 24-48 h para el Brilliant Green, Azul de Metileno y Cristal Violeta (86,3 %, 29,5 % y 26,8 % respectivamente). En el caso del Azul de Metileno el porcentaje disminuyó drásticamente a las 48 h bajando hasta valores de 0 %. Para el resto de los colorantes testados (New Coccine, Reactive Black 5, Bromophenol Blue y Acid

Green 25) la adsorción fue notablemente menor, alcanzándose máximos de adsorción a las 48 -72 h, pero inferiores en todos los casos al 15 %.

En el caso de los fármacos, el Norfloxacin y el Paracetamol alcanzan el máximo de adsorción a las 24 h, si bien los porcentajes registrados fueron muy bajos (1,6 y 2,9 %, respectivamente). A las 48 h encontramos máximos para el Ácido clofibrico (13,3 %) y la Carbamazepina, pero esta con porcentajes de adsorción igualmente inferiores al 3 %.

El BPA, un disruptor endocrino que suele utilizarse como aditivo en los policarbonatos y resinas (Staples *et al.*, 1998) pero no en el PE, no se adsorbió a la superficie del W-MP en las condiciones experimentales usadas (Figura 3).

Por tanto, estos resultados sugieren que la adsorción es un parámetro dependiente no solo del compuesto considerado, sino también del tiempo de contacto, situándose el equilibrio de sorción entre las 24-48 h en la mayoría de los casos.

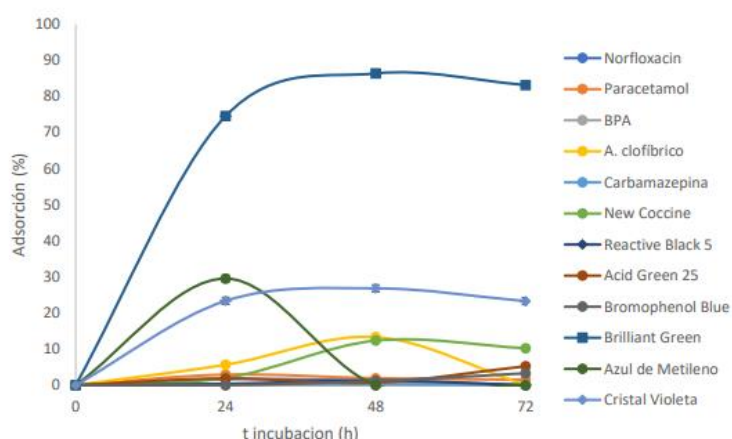


Figura 3. Capacidad de adsorción de los contaminantes orgánicos en estudio a los microplásticos W-MP (valores medios y desviación estándar).

La interacción de un compuesto orgánico al plástico suele estar regida por su hidrofobicidad, que está relacionada con su Kow (constante de partición octanol-agua), de forma que los compuestos orgánicos más hidrofóbicos, con un Kow alto, tendrían una gran afinidad por los polímeros no polares, y, por tanto, una gran capacidad de acumulación en los mismos (O'Connor *et al.*, 2016; Hüffer y Hofmann, 2016). En general, los colorantes testados son hidrofílicos con un bajo coeficiente de partición octanol-agua ($\log Kow = 0,75, 0,765, 0,51$ para el Azul

de Metileno, Brilliant Green y Cristal Violeta, respectivamente), pero algunos han mostrado alta interacción con los W-MPs. Por otro lado, los resultados muestran que otros compuestos, como el BPA, a pesar de presentar un coeficiente de partición octanol-agua superior ($\log K_{ow} = 3,32$) no ha sido adsorbido por los microplásticos en estudio, mientras que, por ejemplo, el Ácido clofíbrico, otro compuesto hidrofóbico utilizado como regulador lipídico y que presenta un valor de k_{ow} alto ($\log K_{ow} = 2,57$), muestra una adsorción intermedia por parte del microplástico (13 %).

Resultados similares han sido reportados por Razanajatovo *et al.* (2018) quienes determinaron porcentajes de adsorción a MPs de PE (45-48 μm) en solución acuosa de los fármacos sertralina, propranolol, y sulfametoxazol, de 28,6 %, 21,6 % y 15,3 %, respectivamente. Estos mismos autores señalan que además de la hidrofobicidad, el pK_a del compuesto y el pH del medio determinan la carga de los solutos, lo cual afecta directamente a la capacidad de sorción de los MPs. Considerando el pH de carga cero (pH_{pzc}) de los MPs de PE (4,30), a un pH en torno a la neutralidad estas partículas tendrían una carga superficial negativa, de forma que, la carga superficial de los compuestos en estudio facilitaría o dificultaría su interacción con los W-MPs. Por tanto, más ensayos son necesarios para investigar la sorción de los compuestos en estudio a distintos valores de pH.

Igualmente, hay trabajos previos que han mostrado cómo MPs de PE, PS y PVC pueden adsorber perfluorooctanesulfonato o perfluorooctanesulfonamida, representantes de contaminantes hidrofílicos que se encuentran frecuentemente en el medio ambiente (Wang *et al.*, 2015). De forma similar, los antibióticos hidrofílicos sulfadiazina, amoxicilina, tetraciclina o clorhidrato de ciprofloxacina también pueden ser retenidos por diversos MPs (Li *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018).

Pero además de los mencionados, el comportamiento de sorción se ve también afectado por otros numerosos factores, como el tipo de polímero, los aditivos que contenga, el grado de cristalinidad o las condiciones ambientales (pH y salinidad entre otros) (Guo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Así, se conoce que las características de adsorción dependen enormemente no solo de las

características fisicoquímicas, sino de parámetros como el color, forma o tamaño de los MPs.

3.2.2 Contaminantes metálicos

Los metales pesados (HM) están catalogados como perjudiciales para los organismos, algunos incluso a baja concentración, debido a su alta toxicidad y carcinogenicidad (Akhbarizadeh *et al.*, 2018). Los HMs pueden adsorberse a los MPs, ambos contaminantes persistentes en el medio ambiente, y desorberse tras su ingestión con un gran potencial de toxicidad y/o acumulación en la cadena alimentaria (Kim *et al.*, 2017). La mayoría de los estudios realizados de adsorción a MPs se han centrado en los contaminantes orgánicos, pero se ha prestado poca atención a compuestos inorgánicos como los metales. Sin embargo, ambos pueden coexistir en sistemas acuáticos y terrestres contaminados, por lo que es importante tener en cuenta su posible interacción a la hora de evaluar el riesgo que ambos suponen para la biota de los sistemas naturales.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad para asociarse a los W-MP de Cu y Zn, dos micronutrientes esenciales, pero que a concentraciones elevadas pueden tener un efecto tóxico sobre los organismos (Feng *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos, muestran que el Zn (II) presentó una adsorción relativamente baja, siendo 0, 12,6 y 13,3 $\mu\text{g/g}$ MP a las 24, 72 y 96 h, respectivamente; en el caso del Cu (II), esta adsorción fue de 2,1 y 5,4 $\mu\text{g/g}$ MP durante las primeras 24-72 h, aumentando después de 96 h hasta los 59,6 $\mu\text{g/g}$ MP (Figura 4). La cantidad de HMs adsorbida por los W-MP, aunque moderada, se encuentra en el rango reportado en trabajos previos. Holmes *et al.* (2012) indicaron que la concentración de Cu^{2+} adsorbido a la superficie de pellets de PE virgen fue de 0,261 $\mu\text{g/g}$, mientras que en el trabajo de Wang *et al.* (2020), la máxima adsorción de Zn (II) encontrada fue de 44,5 $\mu\text{g/g}$, y de 55,1 $\mu\text{g/g}$ en el caso del Cu (II). En general, los MPs de PE han mostrado una mayor capacidad de sorción de metales que los fabricados a partir de otros polímeros. Además, hay que tener en cuenta que los microplásticos envejecidos, expuestos a factores ambientales, presentan una mayor capacidad de sorción, tal como ocurre en el trabajo de Godoy *et al.* (2019), donde utilizando microplásticos de PE reciclados, encontraron adsorciones máximas de 0,4 mg/g para el Zn (II) y de 0,2 mg/g para el Cu (II) en torno a las 300 h de incubación.

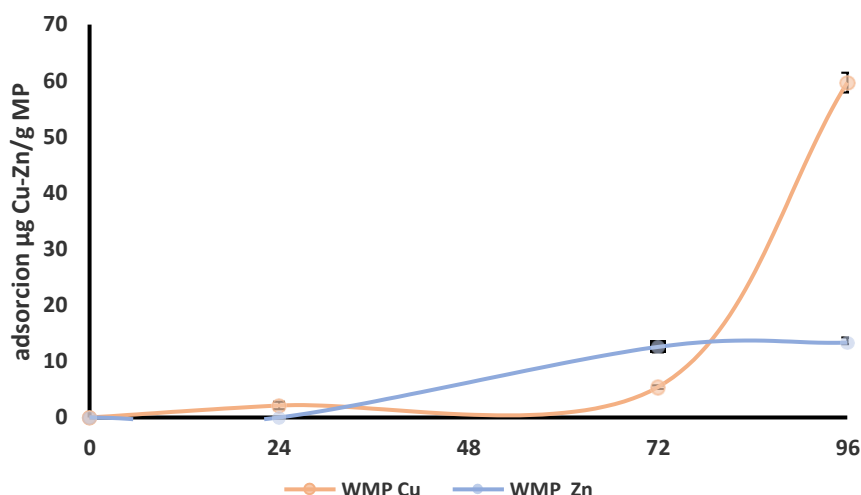


Figura 4. Adsorción de Cu (II) y Zn (II) por los microplásticos W-MPs (valores medios y desviación estándar).

En nuestro estudio, para ambos metales la máxima adsorción se dio a las 96 h, en concordancia con los resultados obtenidos por Wang *et al.* (2020). Sin embargo, hay que considerar que el máximo de sorción y el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de sorción puede variar según las condiciones ambientales y el tipo de microplástico (Wang *et al.*, 2020). Por ejemplo, en ensayos realizados por nuestro grupo de trabajo con otros MPs de PE (blue microspheres), los resultados mostraron una menor capacidad para retener el Cu (II) pero mayor para el Zn (II). Las diferencias de adsorción pueden deberse al aditivo TiO_2 que contiene el microplástico blanco que, como hemos señalado, puede incrementar la adsorción de determinados metales ya que favorece la formación de complejos de superficie cargados que tienen una mayor afinidad por algunos cationes (Mohan y Pittman, 2007; Bayo *et al.*, 2017).

3.3 Toxicidad de los microplásticos W-MP: análisis de niveles de expresión de genes de estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS) y los mecanismos de defensa que ponen en marcha los organismos para contrarrestarlo. La exposición a algunos xenobióticos puede aumentar la concentración de esas especies reactivas y/o disminuir las defensas antioxidantes. De esta forma, la medida de la respuesta antioxidante de los organismos es un biomarcador

frecuentemente utilizado para determinar la ecotoxicidad de un determinado compuesto (Sacca *et al.*, 2014). La respuesta del sistema antioxidante de distintos organismos expuestos a MPs ha variado enormemente, habiendo estudios que reportan desde una inducción a una reducción, pasando por cambios no significativos, dependiendo del tamaño, concentración, tipo de MP y organismo considerado (Martin *et al.*, 2021).

En el presente estudio, se investigaron los efectos de los W-MPs en el sistema antioxidante de *P. aeruginosa*, midiendo cambios en los niveles de expresión de genes (*katB*, *sodB*, *trxA*) que codifican enzimas clave en la protección de las células frente al estrés oxidativo (catalasa, superóxido dismutasa, tioredoxina), como biomarcadores para estudiar el impacto de los MPs en la bacteria. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. La enzima antioxidante superóxido dismutasa se considera la primera barrera del sistema antioxidante intracelular, y es responsable de la eliminación de los radicales superóxido en las células (Lu *et al.*, 2018). En nuestro trabajo, los niveles de expresión de *sodB* no aumentaron en comparación con el tratamiento control tras la exposición a los W-MP durante 96 h. La catalasa es otra importante enzima antioxidante que puede catalizar significativamente el H_2O_2 , protegiendo así a las células del daño causado por el exceso de ROS (Hu *et al.*, 2015). En el presente estudio, tras la exposición de *P. aeruginosa* a los W-MPs, no se detectó un aumento en la expresión del gen *katB*, ni del gen *trxA*, implicado en la prevención de la formación de enlaces disulfuro causado por la presencia de ROS (Fajardo *et al.*, 2013).

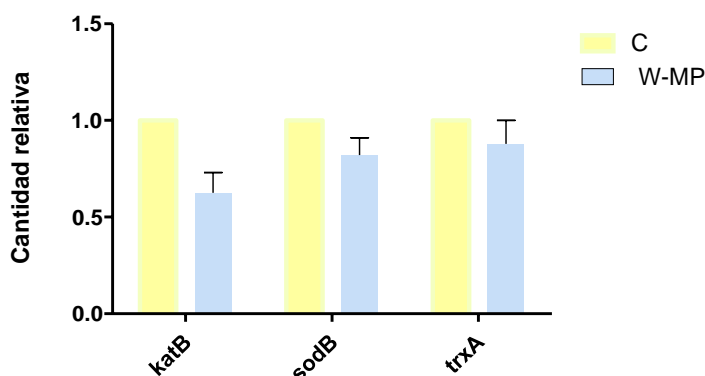


Figura 5. Niveles de expresión en *P. aeruginosa* de los genes indicadores de estrés oxidativo, en ausencia (C) y en presencia de W-MPs (valores medios y desviación estándar).

Otras investigaciones han mostrado que MPs de tereftalato de polietileno redujeron las poblaciones de bacterias clave (*Saprospiraceae*, *Chitinophagaceae* y *Xanthomonadaceae*) en la digestión aeróbica de lodos, debido al estrés oxidativo inducido y/o a la liberación de sustancias químicas tóxicas (Wei *et al.*, 2021). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los W-MPs no produjeron estrés oxidativo en *P. aeruginosa* en las condiciones experimentales utilizadas. Esto puede deberse al tamaño de las partículas estudiadas, puesto que se ha descrito que partículas de menor tamaño, que les permite ingresar más fácilmente en la célula, mostraron efectos tóxicos mayores (Sun *et al.*, 2018).

3.4 Formación de biopelícula sobre los microplásticos W-MP

El llamado “impacto biológico” asociado a los MPs se relaciona con la transferencia de microorganismos (incluyendo especies invasoras, patógenos o bacterias resistentes a antibióticos) dentro de los ambientes naturales, puesto que estos pueden colonizar la superficie de los materiales plásticos y movilizarse con ellos (Martínez-Campos *et al.*, 2021). Las superficies expuestas al agua pueden adsorber grandes cantidades de nutrientes orgánicos en pocas horas y, esta película llamada “acondicionadora”, puede atraer inmediatamente a microorganismos colonizadores que utilizan los nutrientes adsorbidos. Así, la formación de biopelículas en las superficies de los MPs en medios acuosos puede producirse en periodos cortos de tiempo.

En este trabajo se ha usado *P. aeruginosa*, conocido formador de biopelículas, como organismo modelo para estudiar la capacidad de los W-MPs para actuar como sustrato para el desarrollo microbiano. Es una bacteria Gramnegativa, patógeno humano oportunista, que se encuentra en las plantas de tratamiento de aguas residuales y que posee múltiple resistencia a antibióticos (Martínez-Campos *et al.*, 2021). Además, estudios previos han mostrado que patógenos oportunistas del filo *Proteobacteria*, como *P. aeruginosa*, son dominantes en la formación de biopelículas sobre microplásticos (Gong *et al.*, 2019).

En primer lugar, se determinó la densidad óptica (DO) y el número de bacterias cultivables en suspensión en el medio de crecimiento al que se habían añadido

los W-MPs (Figura 6). Valores inferiores de DO y de ufc/ml en este medio podrían relacionarse con una mayor cantidad de células asociadas a los MPs. Los datos obtenidos sugieren que habría una cantidad ligeramente superior de células en suspensión en las muestras que contenían MPs a una concentración del 0,5 % que al 1 % w/v, en cualquier caso, inferiores a la encontrada en el medio en ausencia de MPs (CC). El número de células viables, sin embargo, no mostró diferencias en función de la concentración de MPs testada.

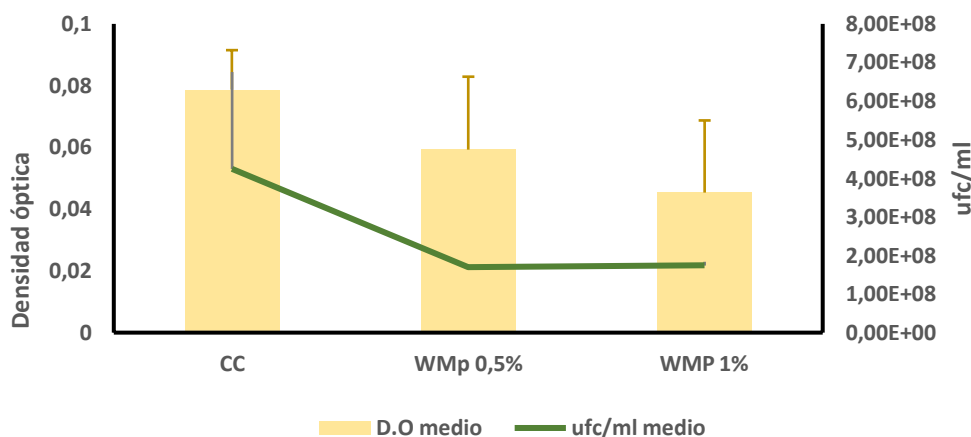


Figura 6. Densidad óptica del medio de cultivo y número de células viables en suspensión (ufc/ml) a las 96 h de incubación en presencia y ausencia de W-MPs a las dos concentraciones testadas (valores medios y desviación estándar).

3.4.1 Caracterización de la biopelícula por FTIR y SEM

Una vez eliminado el medio de crecimiento, se recuperaron los MPs y se caracterizó la biopelícula formada mediante FTIR y SEM.

La identificación de estructuras moleculares del biofilm a partir de técnicas como FTIR puede resultar interesante para entender las interacciones que se producen durante la unión y el desarrollo de microorganismos sobre las superficies de los MPs. Los resultados obtenidos muestran un ligero cambio en el espectro con respecto al W-MP original, posiblemente como resultado de la actividad metabólica de *P. aeruginosa* durante la formación de la biopelícula. En los espectros obtenidos mediante FTIR podemos encontrar las bandas en torno a 2800-2900 cm^{-1} y 1420-1450 cm^{-1} , que ya aparecían en la caracterización inicial del microplástico, si bien de menor intensidad por el posible enmascaramiento del polímero como consecuencia del crecimiento microbiano (Figura 7). Sin

embargo, después de la formación de la biopelícula, el espectro FTIR muestra nuevos picos en $1600-1650\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a la amida II (enlace N-H) y amida I (enlace C=O) (Anexo I: Tabla 3).

La aparición del pico asociado a las amidas puede ocurrir como resultado del aumento en el contenido de proteínas (Kelestemur y Culha 2018), componente fundamental junto con exopolisacáridos y ADN, de la matriz polimérica extracelular que se forma en el desarrollo de la biopelícula. Por tanto, la detección de esta banda podría postularse como un biomarcador interesante para determinar el desarrollo microbiano sobre los MPs.

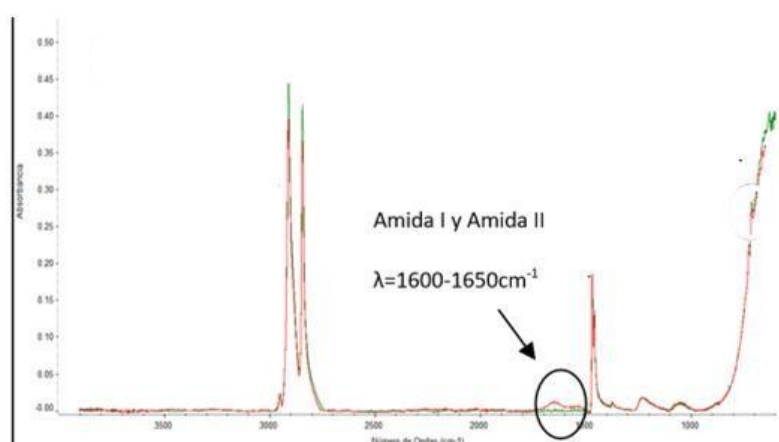


Figura 7. Representación del espectro obtenido mediante FTIR del microplástico inicial (línea verde) y el microplástico después de la formación de la biopelícula (línea roja).

En la Figura 8, las imágenes de SEM muestran claramente que los microorganismos no solo proliferan en la superficie del W-MP, sino que están embebidos en una matriz polimérica, constituida por polisacáridos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (Kelestemur y Culha 2018). Ello, como se ha sugerido, podría aumentar la superficie de unión a la partícula plástica y formar heteroagregados con otras sustancias que podrían ser ingeridas por organismos e ingresar en las cadenas tróficas (Cole, 2011; Rummel, 2017).

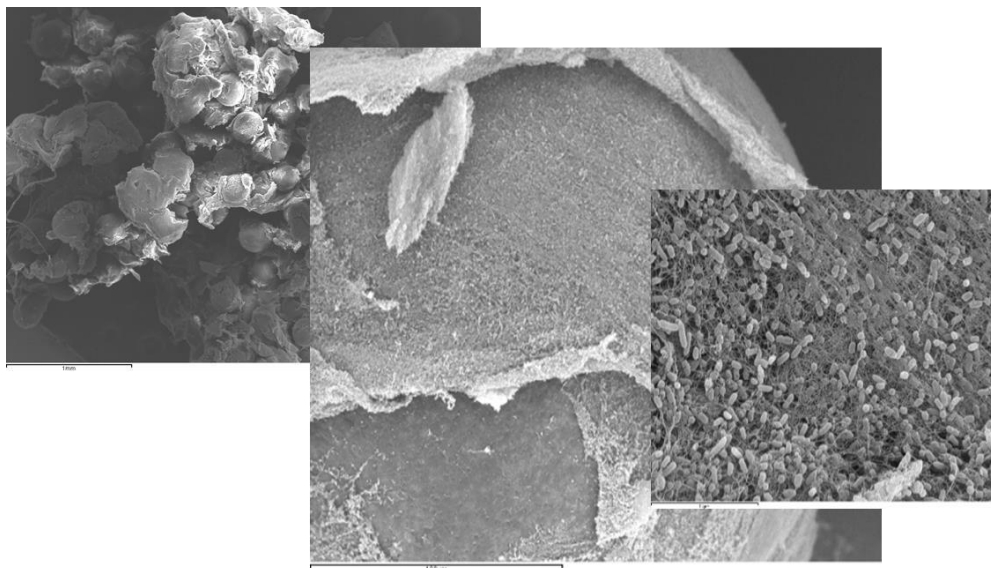


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) del microplástico W-MP tras la formación de la biopelícula.

3.4.2 Estimación de la biomasa de la biopelícula

El recuento de células viables adheridas a los MPs mostró que éstas eran ligeramente más abundantes cuando se incrementaba la concentración de MPs (Tabla 1). De forma similar, los resultados indicaron que la concentración de proteínas en el biofilm era mayor cuando el MP era añadido al medio a una concentración del 1 % w/v. Los datos obtenidos del contenido proteico en la biopelícula son comparables a los reportados por Gong *et al.* (2019) estudiando la colonización bacteriana de MP de PE en microcosmos de agua de lago.

Tabla 1. Recuentos de células viables y concentración de proteínas en la biopelícula formada sobre W-MP (valores medios \pm desviación estándar).

	Viabilidad (ufc/ml)	Proteínas (μ g/ml)
W-MP 0,5 % (w/v)	$9,80 \times 10^8 \pm 4,2 \times 10^8$	$89,5 \pm 5,2$
W-MP 1 % (w/v)	$1,37 \times 10^9 \pm 2,7 \times 10^8$	$184,5 \pm 41,8$

Por tanto, según estos resultados los microorganismos tienen capacidad para colonizar MPs de PE, y el desarrollo de la biopelícula formada (biomasa) parece aumentar con la concentración de estos, lo cual podría tener importantes implicaciones ambientales.

3.5 Efecto de la biopelícula en la adsorción de contaminantes

3.5.1 Contaminantes orgánicos

Se evaluó la capacidad del complejo MP-biopelícula para adsorber los compuestos que habían mostrado mayor adsorción en la superficie del microplástico prístino, Cristal Violeta, Blue Green y Azul de Metileno (apartado 3.2.1). Los resultados obtenidos, mostraron que todos los compuestos testados fueron adsorbidos por la biopelícula formada sobre el microplástico W-MP (Figura 9).

Tras un periodo de incubación de tan solo 1 h con los W-MPs y la biopelícula asociada, el porcentaje de adsorción de Azul de Metileno fue de 11 %, 29,7 % para el Blue Green y 76,3 % para el Cristal Violeta. Si comparamos estos datos con los porcentajes adsorbidos por el microplástico sin colonizar veremos que son más altos. Ello indicaría que las biopelículas podrían actuar como biosorbentes eficientes de estos compuestos orgánicos.

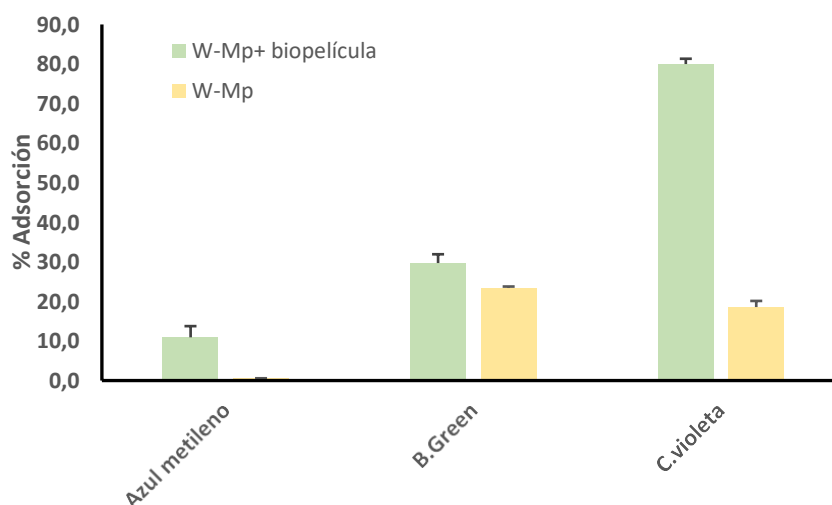


Figura 9. Porcentajes de adsorción de contaminantes orgánicos al W-MP y a la biopelícula formada sobre los W-MPs (valores medios y desviación estándar).

Hasta dónde llega nuestro conocimiento, son muy escasos los estudios que aborden la influencia de la biopelícula sobre la capacidad de sorción de compuestos orgánicos en MPs. Jin *et al.* (2020) encontraron que las biopelículas asociadas a los microplásticos actuaban como sustratos de adhesión de compuestos hidrofóbicos como los HAPs y PCBs, que eran degradados por las bacterias. Además, Magadini *et al.* (2020) relacionaron la formación de

biopelículas sobre diferentes tipos de microplásticos con una mejor una sorción de productos farmacéuticos, como el ibuprofeno, en lugares cercanos a zonas de descarga de estaciones de tratamiento de aguas residuales.

En esta misma línea, los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que el desarrollo de microorganismos sobre las partículas plásticas podría incrementar las posibilidades de que estas actuaran como vectores de contaminación.

3.5.2 Contaminantes metálicos (Cu)

Para evaluar el efecto de la biopelícula en la adsorción de metales se seleccionó el Cu (II) puesto que presentó una mayor adsorción a los W-MPs en solución acuosa (apartado 3.2.2).

Tu *et al.* (2020) han descrito que la formación de biopelículas reducía la hidrofobicidad de la superficie de PE MPs, y aumentaba la abundancia de grupos carboxilo y cetona que incrementaría la interacción con cationes metálicos. Otros autores también han señalado que el aumento de biopelícula formada sobre MPs de ácido poliláctico y polietileno de baja densidad, conllevaba un aumento en la adsorción de cobre en ambientes naturales de aguas de estuarios (Richard *et al.*, 2019).

Todo ello puede tener implicaciones en los ciclos de nutrientes, generar problemas de toxicidad y de bioacumulación. A través de la asociación con microplásticos, los metales pueden ser transportados desde zonas donde la concentración es alta a zonas de baja concentración, donde pueden actuar como nutrientes y, por tanto, resultar beneficioso para los organismos (Barnes, 2002). Sin embargo, la formación de biopelículas asociadas también puede concentrar estos metales hasta alcanzar niveles tóxicos.

Los datos obtenidos en este trabajo apuntarían a que la adsorción de Cu (II) sería mayor cuando se ha formado la biopelícula sobre el W-MP (175 µg/g MP) que en ausencia de esta (125 µg/g MP). Sin embargo, considerando que se ha registrado una disminución de la concentración de Cu (II) en la fase acuosa de la muestra que contenía solo *P. aeruginosa* (CC) (aproximadamente el 8 %), estos resultados no serían concluyentes, siendo necesario llevar a cabo más ensayos para dilucidar este aspecto.

4. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado como algunos contaminantes pueden ser rápidamente adsorbidos por MPs de PE bajo condiciones de laboratorio. Los colorantes Cristal Violeta, Azul de Metileno y Brilliant Green se unen a la superficie del plástico en porcentajes elevados, mientras que otros más hidrofóbicos no muestran adsorción en las condiciones testadas. El cobre mostró una moderada capacidad de unión a la superficie del microplástico en estudio, lo que se atribuye a la presencia de TiO_2 que contiene como aditivo.

Los MPs en estudio no produjeron estrés oxidativo en *P. aeruginosa*, posiblemente por el tamaño de las partículas utilizadas, lo que permite el desarrollo del microorganismo sobre la superficie plástica. En concreto, los resultados sugieren que a mayor concentración de microplásticos, la biomasa de la biopelícula desarrollada es ligeramente superior. La espectroscopía y la microscopía se han revelado como herramientas analíticas útiles para caracterizar dicha biopelícula. Por otro lado, las biopelículas formadas sobre los W-MPs tendrían mayor capacidad de adsorción de algunos contaminantes orgánicos testados que las partículas plásticas originales.

Por lo tanto, los MPs en estudio podrían desempeñar un papel importante en el destino de contaminantes orgánicos e inorgánicos en los ecosistemas acuáticos, actuando como vectores de contaminación. Debido a la mezcla de diferentes contaminantes y diversos microplásticos que se encuentran en el medio ambiente, será importante para futuras investigaciones estudiar la sorción/desorción competitiva de distintos compuestos en microplásticos de diferentes tipos y tamaños, y en diferentes condiciones ambientales. Así mismo para evaluar el riesgo ambiental asociado a la contaminación por MPs es necesario prestar especial atención a la influencia de la biopelícula que pueda desarrollarse sobre ellos en los ambientes naturales.

Bibliografía

- Abe, K., Nomura, N., Suzuki, S., 2020. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol. Ecology*. 96(5), fiae031. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae031>
- Ahn, S., Jung, J., Jang, I.A., Madsen, E.L., Park, W., 2016. Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. *Journal of Biological Chemistry*, 291(22), 11928-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708149>
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (8), 1596-1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Arias-Andres, M., Klumper, U., Rojas-Jimenez, K., Grossart, H.P., 2018. Microplastic pollution increases gene exchange in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*. 237, 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.058>
- Atugoda, T., Vithanage, M., Wijesekara, H., Bolan, N., Sarmah, A.K., Bank, M.S., You, S., Sik, Y., 2021. Interactions between microplastics, pharmaceuticals and personal care products. *Environment International*, 149, 106367. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106367>
- Akhbarizadeh, R., Moore, F. and Keshavarzi, B., 2018. Investigating a probable relationship between microplastics and potentially toxic elements in the muscles of fish from the northeast Persian Gulf. *Environmental Pollution*, 232, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.028>
- Barnes, D.K., 2002. Biodiversity: invasions by marine life on plastic debris. *Nature*, 416, 808-809. <https://doi.org/10.1038/416808a>
- Bayo, J., Martínez, A., Guillén, M., Olmos, S., Roca, M.-J., Alcolea, A., 2017. Microbeads in commercial facial cleansers: threatening the environment. *Clean Soil Air Water*, 45 (7), 1600683. <https://doi.org/10.1002/clen.201600683>
- Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: a modeling study. *Environmental Pollution*, 220, 540-548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.001>
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I. y Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>
- Browne, MA, Crump, P., Niven, SJ, Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T. y Thompson, R., 2011. Accumulation of Microplastic on Shorelines. *Environmental Science & Technology*, 45 (21), 9175-9. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588-2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Corradini, F., Meza, P., Eguiluz, R., Casado, F., Huerta-Lwanga, E., & Geissen, V., 2019. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. *Science of The Total Environment*, 671, 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.368>
- De Tender, C.A., Devriese, L.I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., Dawyndt, P., 2015. Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environmental Science & Technology*, 49 (16), 9629-9638. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01093>
- Devers, M., Soulas, G., & Martin-Laurent, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.015>

- Eckert, E.M., Di, C.A., Kettner, M.T., Arias-Andres, M., Fontaneto, D., Grossart, H.P., 2018. Microplastics increase impact of treated wastewater on freshwater microbial community. *Environmental Pollution*, 234, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.070>
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C., 2015. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs, *Water Research*. 75, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.012>
- Elizalde-Velázquez, A., Subbiah, S., Anderson, T.A., Green, M.J., Zhao, X., Cañas-Carrell, J.E., 2020. Sorption of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) common to microplastics. *Science of The Total Environment*, 715, 136974. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136974>
- Endo, S., Koelmans, A.A., 2016. Sorption of hydrophobic organic compounds to plastics in the marine environment: equilibrium. In: Takada, H., Karapanagioti, H. (Eds.), *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment*. Springer International Publishing, 78, 75–100.
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., Amato, S., 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.007>
- Fajardo, C., Saccà, M.L., Martinez-Gomariz, M., Costa, G., Nande, M., Martin, M., 2013. Transcriptional and proteomic stress responses of a soil bacterium *Bacillus cereus* to nanosized zero-valent iron (nZVI) particles. *Chemosphere*, 93(6), 1077–83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.082>
- Feng, J., Lin, Y., Yang, Y., Shen, Q., Huang, J., Wang, S., Zhu, X., Li, Z., 2018. Tolerance and bioaccumulation of combined copper, zinc, and cadmium in *Sesuvium portulacastrum*. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.040049>
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Godoy, V., Blázquez, G., Calero, M., Quesada, L., Martín-Lara, M.A. 2019. The potential of microplastics as carriers of metals. *Environmental Pollution*, 255, 113363. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113363>
- Gong, M., Yang, G., Zhuang, L. y Zeng, E.Y., 2019. Microbial biofilm formation and community structure in low-density polyethylene microparticles in lake water microcosm. *Environmental Pollution*, 252, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.090>
- Guo, X., Pang, J., Chen, S., Jia, H., 2018. Sorption properties of tylosin on four different microplastics. *Chemosphere*, 209, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.100>
- Harrison, J.P., Schratzberger, M., Sapp, M., Osborn, A.M., 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiology*, 14, 232. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0232-4>
- He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., & Lü, F. 2019. Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? Evidence of microplastics in landfill leachate. *Water research*, 159, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.060>
- Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. *Environmental Pollution Bulletin*, 160, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.052>
- Hu, C., Wang, Q., Zhao, H., Wang, L., Guo, S., Li, X., 2015. Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere*, 128, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.040>

- Hüffer, T., Hofmann, T., 2016. Sorption of non-polar organic compounds by micro-sized plastic particles in aqueous solution. *Environmental Pollution*, 214, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.018>
- Jin, M., Yu, X., Yao, Z., Tao, P., Li, G., Yu, X., Zhao, J.L., Peng, J., 2020. How biofilms affect the uptake and fate of hydrophobic organic compounds (HOCs) in microplastic: Insights from an In situ study of Xiangshan Bay, China. *Water Resources*, 184, 116118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116118>
- Keleştemur, S., Avci, E. y Çulha, M. 2018. Raman and Surface-Enhanced Raman Scattering for Biofilm Characterization. *Quimiosensors*, 6, 5. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6010005>
- Kim, D., Chae, Y., An, Y.J., 2017. Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, 51, 12852–12858. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03732>
- Koelmans, A.A., Bakir, A., Burton, G.A., Janssen, C.R., 2016. Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental Science & Technology*, 50, 3315–3326. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06069>
- Kurniawan, A., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., Morisaki, H., 2012. Analysis of the ion adsorption-desorption characteristics of biofilm matrices. *Microbes Environ*, 27, 399–406. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME11339>
- Lehner, R., Weder, C., Petri-Fink, A. and Rothen-Rutishauser, B., 2019. Appearance of nanoplastics in the environment and possible impact on human health. *Environmental Science & Technology*, 53, 1748-1765. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>
- Lin, D., Yang, G., Dou, P., Qian, S., Zhao, L., Yang, Y., Fanin, N., 2020. Microplastics negatively affect soil fauna but stimulate microbial activity: insights from a field-based microplastic addition experiment. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 287 (1934). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1268>
- Li, J., Zhang, K., Zhang, H., 2018. Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution*, 237, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.050>
- Lithner, D., Larsson, Å. Y Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment*, 409, 3309-3324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Liu, P., Zhan, X., Wu, X., Li, J., Wang, H. y Gao, S., 2020. Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: Properties, sorption and potential risks. *Chemosphere*, 242, 125193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125193>
- Lobelle, D., Cunliffe, M., 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013>
- Lu, T., Zhu, Y., Xu, J., Ke, M., Zhang, M., Tan, M., Fu, Z., Qian, H., 2018. Evaluation of the toxic response induced by azoxystrobin in the non-target green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Pollution*, 234, 379-388. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.081>
- Magadini, D.L., Goes, J.I., Ortiz, S., Lipscomb, J., Pitiranggon, M., Yan, B.. Assessing the sorption of pharmaceuticals to microplastics through in-situ experiments in New York City waterways. *Science of the Total Environment*, 729, 138766. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138766>
- Martín, C., Fajardo, C., Costa, G., Sánchez-Fortún, S., San Andrés, MD, González, F. y Martín, M., 2021. Bioassays to assess the ecotoxicological impact of polyethylene microplastics and two organic pollutants, simazine and ibuprofen. *Chemosphere*, 274, 129704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129704>

- Martínez-Campos, S., González-Pleiter, M., Fernández-Piñas, F., Rosal, R. y Leganés, F., 2021. Early and differential bacterial colonization on microplastics deployed into the effluents of wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 757, 143832. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143832>.
- Miao, L., Wang, P., Hou, J., Yao, Y., Liu, Z., Liu, S. y Li, T., 2019. Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics. *Science of the Total Environment*, 650, 2395-2402. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.378>
- Mohan, D. y Pittman, C.U., 2007. Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—A critical review. *Hazardous Materials Magazine*, 142(1-2), 1-53. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.006>
- Obbard, R.W., Sadri, S., Wong, Y.Q., Khitun, A.A., Baker, I., Thompson, R.C., 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future*, 2(6), 315-320. <https://doi.org/10.1002/2014EF000240>
- Parrish, K., Fahrenfeld, N.L., 2019. Microplastic biofilm in fresh- and wastewater as a function of microparticle type and size class. *Environmental Science-Water Research & Technology*, 5, 495–505. <https://doi.org/10.1039/C8EW00712H>
- Plastics—the facts, 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data.
- Razanajatovo, R.M., Ding, J., Zhang, s., Jiang, H., Zou, H. 2018. Sorption and desorption of selected pharmaceuticals by polyethylene. *Marine Pollution Bulletin*, 136, 516-523. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.09.048doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.09.048
- Richard, H., Carpenter, E.J., Komada, T., Palmer, P.T., Rochman, C.M., 2019. Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. *Science of Total Environment*, 683, 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.331>
- Rillig MC., 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental science & technology. Environmental & Science Technology*. 46, 6453–6454. <https://doi.org/10.1021/es302011r>
- Rist, S. and Hartmann, N.B., 2018. Aquatic ecotoxicity of microplastics and nanoplastics: Lessons learned from engineered nanomaterials. *Handbook of Environmental Chemistry*, 58, 25-49, https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_2
- Rummel, C.D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., Schmitt-Jansen, M., 2017. Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environmental & Science Technology*, 4, 258–267. <https://doi.org/10.1021/acs>.
- Shen, X.C., Li, D.C., Sima, X.F., Cheng, H.Y., Jiang, H., 2018. The effects of environmental conditions on the enrichment of antibiotics on microplastics in simulated natural water column. *Environmental Research*, 166, 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.034>
- Staples, C.A., Dome, P.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., Harris, L.R., 1998. A Review of the Environmental Fate, Effects, and Exposures of Bisphenol A. *Chemosphere*, 36 (10), 2149-2173. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)10133-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)10133-3)
- Sacca, M.L., Fajardo, C. Costa, G., Iobo, C., Nande, M. Martín, M., 2014. Integrating classical and molecular approaches to evaluate the impact of nanosized zero-valent iron (nZVI) on soil organisms. *Chemosphere*, 104, 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.013>
- Sun, X., Sun, M., Ye, M., Jiao, W., Feng, Y., Yu, P., Liu, M., Jiao, J., He, X., Liu, K., Zhao, Y., 2018. Changes in tetracycline partitioning and bacteria/phage mediated ARGs in microplastic-contaminated greenhouse soil facilitated by sphorolipid. *Journal of Hazard Materials*, 345, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.036>

- Tribedi, P., Sil, A.K., 2013. Bioaugmentation of polyethylene succinate contaminated soil with *Pseudomonas* sp. AKS2 results in increased microbial activity and better polymer degradation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20, 1318-1326. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1080-0>
- Triebkorn, R., Braunbeck, T., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Jekel, M., Knepper, T., Krais, S., Müller, Y., Pittroff, M., Ruhl, A., Schmieg, H., Schür, C., Strobel, C., Wagner, M., Zumbülte, N., Köhler, H.R., 2019. Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystem: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>
- Tu, C., Chen, T., Zhou, Q., Liu, Y., Wei, J., Wanek, J. J., et al., 2020. Biofilm formation and its influences on the properties of microplastics as affected by exposure time and depth in the seawater. *Science of the Total Environment*, 734, 139237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139237>
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environment Pollution*, 182, 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.013>
- Viršek, M.K., Lovšin, M.N., Koren, S., Kržan, A., Peterlin, M., 2017. Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine Pollution Bulletin*, 125 (1–2), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.024>
- Wahl, A., Le Juge, C., Davranche, M., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., & Gigault, J., 2020. Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere*, 262, 127784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>
- Wang, F., Shih, K.M., Li, X.Y., 2015. The partition behavior of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanesulfonamide (FOSA) on microplastics. *Chemosphere*, 119, 841–847. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.047>
- Wang, L., Luo, Z., Zhen, Z., Yan, Y., Yan, C., Ma, X.,y Hu, A., 2020. Bacterial community colonization on tire microplastics in typical urban water environments and associated impacting factors. *Environment Pollution Resources*, 265, 114922. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114922>
- Wei, W., Chen, X., Peng, L., Liu, Y., Bao, T., Ni, B.J., 2021, The entering of polyethylene terephthalate microplastics into biological wastewater treatment system affects aerobic sludge digestion differently from their direct entering into sludge treatment system. *Water Resources*. 190, 116731. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116731>
- Yu, F., Yang, C., Zhu, Z., Bai, X., & Ma, J., 2019. Adsorption behavior of organic pollutants and metals on micro/nanoplastics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, 694, 133643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133643>
- Zettler, E.R., Mincer, T.J. y Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>

Anexo I: Tablas

Tabla 1. Concentración y máximos de absorción de los compuestos orgánicos en estudio.

	Concentración (μM)	Máximo de absorción (nm)
Norfloxacin	25	270
Paracetamol	100	270
BPA	100	270
Acido clofibrico	100	270
Carbamazepina	100	270
New Coccine	20	506
Reactive Black 5	20	596
Acid Green 25	20	608
Bromophenol Blue	20	590
Cristal Violeta	20	592
Azul de Metileno	20	665
Brilliant Green	20	624

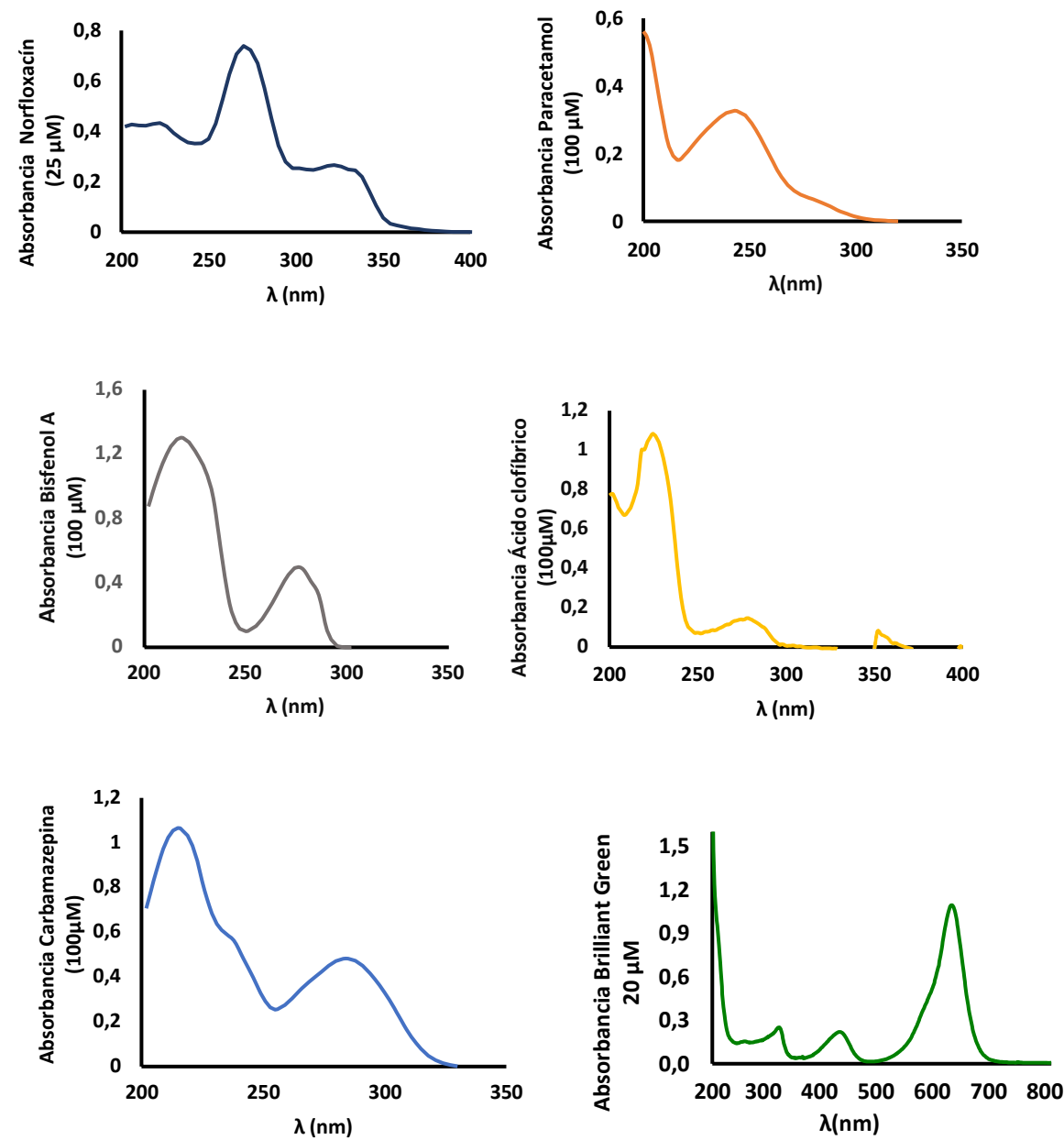
Tabla 2. Conjunto de cebadores utilizados para los análisis qPCR.

	Cebadores	Tamaño del producto (bp)	
	5'-3'		
	3'-5'		
<i>kat B</i>	CCTACGGCAAGAAGGACCAG GTAGTCGCTGTCAGCCTTGT	119	Ahn et al., 2016
<i>sod B</i>	CTACTGGAAGTGCCTGAGCC CCGACGGGAAGTCCTGGTGAA	123	
<i>trx A</i>	GGGACTATCAGGGCAAGCTG CGACATTGCCGTCCTGAAC	120	
16S rDNA	CTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGAATTAAACCACATGCTCCAC	178	Devers et al., 2004

Tabla 3. Asignación de enlaces FTIR-RAMAN

Grupo funcional/vibración	Región
$\nu(\text{C-S})$ aromáticas	$<1000\text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{CC})$ aromáticas	1580-1600 cm^{-1}
$\delta(\text{CH}_3)$	1380 cm^{-1}
$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CH}_3)$ asimétrica	1400-1470 cm^{-1}
$\nu(\text{N=N})$	1480-1500 cm^{-1}
$\nu(\text{C=N})$	1610-1680 cm^{-1}
$\nu(\text{C=C})$	1500-1900 cm^{-1}
$\nu(\text{C-H})$	2800-3000 cm^{-1}
$\nu(\text{N-H})$	3300-3500 cm^{-1}

Anexo II: Figuras



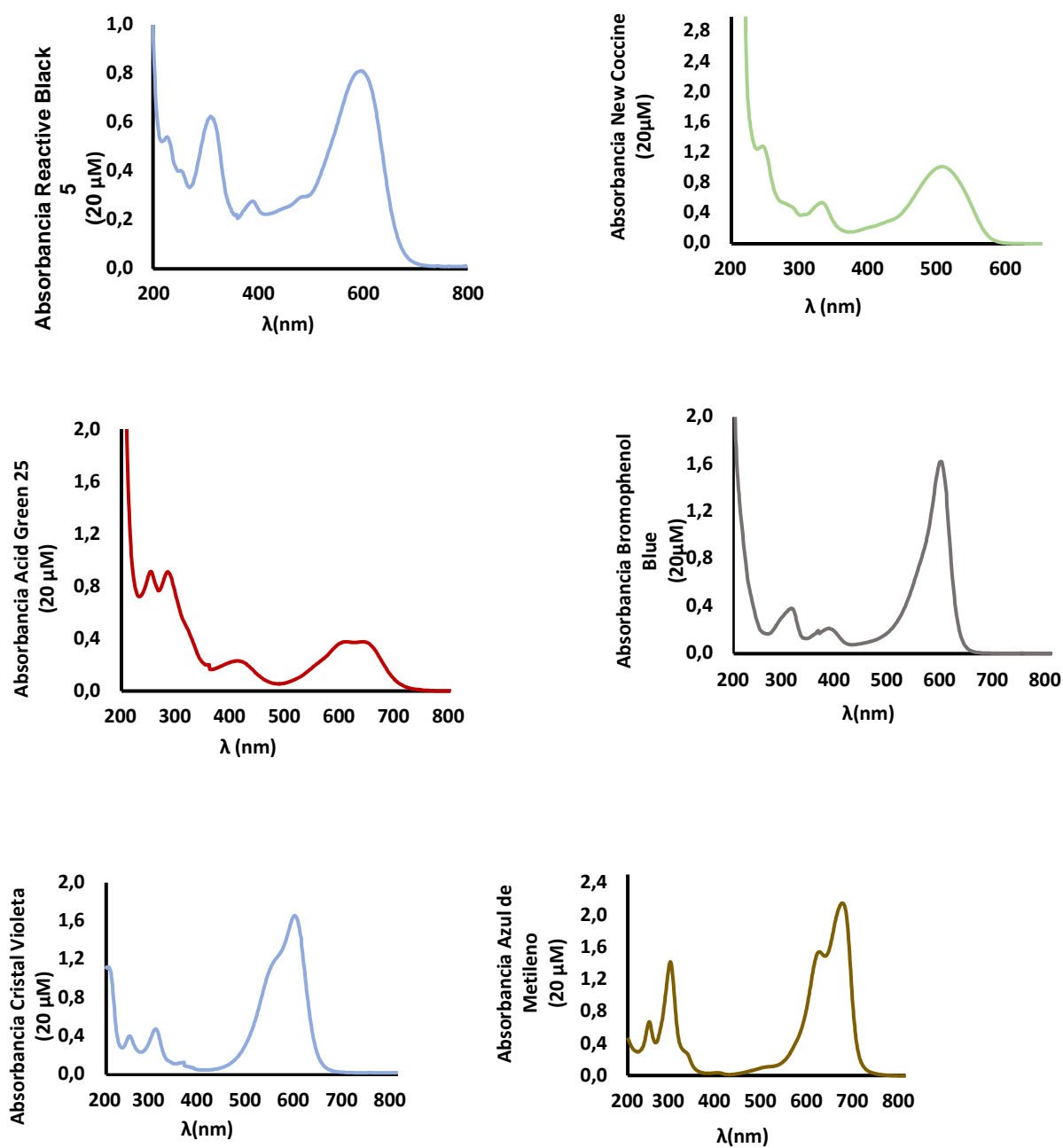


Figura 1. Espectros de absorción de los contaminantes orgánicos en estudio.